

## Rekombinant DNA Teknolojisinin Veteriner Aşılarında Kullanımı

Merve Gizem Sezener, Alper Çiftci, Arzu Fındık

*Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye*

Geliş Tarihi / Received: 10.09.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 13.10.2018

**Özet:** İlk keşfedildiği yıllardan bu yana aşılar, infeksiyöz hastalıkların kontrolü için en etkili, nispeten ucuz maliyetli ve sürdürülebilir bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bugün veteriner hekimlikte çoğunlukla canlı attenüe, inaktif ve toksoid aşılar kullanılmakla birlikte, daha güvenilir ve etkili aşılarla olan gereksinimden dolayı, rekombinant DNA teknolojisi önemli bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Tüm dünyada bu teknolojinin kullanıldığı aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu derlemede, veteriner hekimlikte hali hazırda kullanılan ve çeşitli hayvan türlerinin önemli bazı infeksiyonlarını kontrol altına almak için üzerinde çalışmalara devam edilen rekombinant aşılarla yer verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Aşı, DNA, Rekombinant, Veteriner

### The Use of Recombinant DNA Technologies in Veterinary Vaccines

**Abstract:** Since their first exploration, vaccines have been used as the most effective, relatively inexpensive and sustainable method of controlling infectious diseases. Today, most of the licensed veterinary vaccines are in the form of live attenuated, inactive and toxoids. However, recombinant DNA technology has emerged as an important strategy because of the need for more effective and safety vaccines. All over the world, vaccine development studies using this technology are ongoing. In this review, currently used recombinant vaccines in veterinary medicine and also ongoing researches on development of new recombinant vaccines to be used to control some vital infections of various animal species were discussed.

**Key words:** DNA, Recombinant, Vaccine, Veterinary

### Giriş

Hastalıklara karşı koruma sağlamak amacıyla vücuda verilmek üzere tasarlanmış, zayıflatılmış veya inaktif hale getirilmiş patojenler olarak tanımlanan aşılar, tarihsel süreç içerisinde immunoloji, moleküler biyoteknoloji, biyokimya, genomiks ve proteomiks alanlarındaki gelişmelerle birlikte daha yeni teknolojilerle üretilebilir hale gelmiştir. Aşı teknolojilerindeki gelişmeler, farklı avantajlara sahip aşılarda geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknolojilerden biri de rekombinant DNA (rDNA) teknolojisidir. Hastalık etkenlerine ait çeşitli genlerin klonlanması, ekspresyon sistemlerinde eksprese edilmesi ve saflaştırılması esasına dayanan gerek insan hekimliği gerekse veteriner hekimlikte kullanılmakta olan rekombinant aşılar bulunmaktadır. Birçok hastalığa karşı rDNA teknolojisinin kullanıldığı aşı geliştirme çalışmaları da devam etmektedir [14].

### Rekombinant DNA teknolojisi

rDNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay bir şekilde gerçekleştirilmesi esasına

dayanmaktadır. Teknoloji, çeşitli kaynaklardan elde edilen ve istenilen bir gen sekansına sahip DNA parçalarının uygun bir vektör aracılığıyla başka bir konağa (ekspresyon sistemleri) aktarılmasını içerir. Multidisipliner uygulamalara sahip olan bu teknoloji, aynı zamanda yaşamla ilgili olarak sağlığın iyileştirilmesi, gıda kaynaklarının artırılması ve farklı çevresel olumsuz etkilere karşı direnç gibi önemli konulara çözüm getirme potansiyeline de sahiptir. Rekombinant farmasötiklerin günümüzde güvenle kullanılmasının yanında bu teknoloji, gen terapisi ve genetik modifikasyonlar ile birlikte biyosağaltım ve önemli hastalıklara müdahalede kullanılmaktadır [14]. Aşı veya teşhis aracı geliştirilmesinde, attenüe/inaktif hücre kültürü mikrobiyel etken antijenlerinin büyük miktarlarda elde edilmesindeki güçlükler, bu teknolojinin kullanılması ile aşılabilmektedir. rDNA teknolojisi kullanılarak, istenilen gen ürünü protein, büyük miktarlarda, saf ve natif formda elde edilebilmektedir. Seriden seriye ("batch"den "batch"e) varyasyon göstermemesi ve güvenilir ürünler olması, rekombinant proteinlerin konvansiyonel yöntemlerle üretilen aşılarla göre sahip olduğu önemli avantajdır [2].

## Rekombinant DNA teknolojisinin veteriner aşılarında kullanımı

Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşılar “rekombinant aşı” olarak adlandırılmaktadır [10]. Rekombinant aşıların hastalığa neden olmamaları ve güçlü immun yanıt oluşturmaları önemli avantaj-

larındandır. İlk rekombinant aşılar, yaban hayatında kuduz hastalığını kontrol altına almak için 1980’lerin sonlarında geliştirilmiştir [25].

Şu an piyasada ticari olarak bulunan rekombinant veteriner aşılar Tablo 1’de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Mevcut ticari rekombinant veteriner aşıları

Hedef Patojen	Hedef Hayvan	Marka İsmi	Özelliği	Kaynak
<i>Brucella abortus</i>	Sığır	RB-51	Rifamisin dirençli R	[19].
<i>Streptococcus equi</i>	At	Equilis StrepE	<i>aroA</i> silinmiş canlı aşı	[13].
<i>Chlamydomphila abortus</i>	Koyun	Ovilis Enzovax	Isıya duyarlı canlı aşı	[4].
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Tavuk	Vaxsafe MS	Isıya duyarlı canlı aşı	[20].
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Tavuk	Vaxsafe MG	Isıya duyarlı canlı aşı	[3].
<i>Salmonella spp.</i>	Hindi ve tavuk	Megan Vac1	Çift geni silinmiş <i>S. Typhimurium</i>	[1].
<i>Bordetella avium</i>	Hindi	Art Vax	Isıya duyarlı canlı mutant suş	[12].
BHV-1	Sığır	Bovilis IBR Marker	gE geni silinmiş marker aşı	[28].
Equine Influenza Virus	At	Proteq-Flu	Canarypox virus vektör aşısı	[18].
West Nile Virus	At	West Nile- Innovator DNA	DNA aşısı	[7].
HTV ve IBDV	Tavuk	Vaxxitek HVT + IBD	Canlı rekombinant aşı	[6].
NDV	Tavuk	NA	HN rekombinant aşı	[24].
H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> ve NDV	Tavuk	Vectormune FP-ND	Fowlpox virus vektör aşı	[24].
Kuduz	Köpek	Raboral	Vaccinia virus rekombinant aşı	[17].
Parvovirus	Köpek	Recombitek Canine Parvo	Canarypox virus vektör aşısı	[23].
Kedi Lösemi Aşısı	Kedi	Eurifel FeLV	Canarypoxvirus vektör aşısı	[23].
IHN	Alabalık	Novartis	DNA aşısı	[27].

**Sığır, koyun ve keçiler için rekombinant aşılar:** Sığırların klinik ve ekonomik açıdan önemli hastalıkları; sığır solunum sistemi kompleksi (shipping fever), inek-buzağı işletmelerindeki solunum sistemi enfeksiyonları ve yavru atmalardır. Bu hastalıklara yönelik rekombinant aşı denemeleri günümüzün güncel çalışma konularındandır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde şu an kullanım için ruhsatlandırılmış rekombinant sığır, koyun ve keçi için rekombinant aşılar piyasada bulunmamakla birlikte [11]; İnfeksiyöz Sığır Rinotraheitisi (IBR) eradikasyon programı için doğal olarak oluşan glikoprotein E (gE) silinmiş IBR aşısı Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır. IBR, besi sığırlarında solunum yolu hastalıklarının yanı sıra üremeye ilgili hastalıklar, konjunktivitis ve sinir sistemi hastalıklarından sorumlu bir Herpesvirus enfeksiyonudur. gE

geninin silinmesi, IBR virusunu zayıflatmakta ve sığırların sekresyonlarıyla saçılımını engellemektedir. Bu modifiye edilmiş canlı aşı, her yaş sığır için immunojeniktir ve güvenlidir [11]. Hastalıkların eradikasyon programları için, DIVA yaklaşımı olarak bilinen, infekte olanları aşılansmış hayvanlardan ayırt etme işlemi önemlidir. Gen silinmiş veya marker aşıların kullanımı, aşı içindeki marker veya vahşi türe ait virüslerle özgü proteinlere yönelik antikorların test edilmesine olanak sağlamakta ve doğal olarak maruz kalan hayvanlardan aşılansmaları ayırt etmek için kullanılmaktadır. Bu aşının bir diğer önemli avantajı gE silinmiş aşı virusunun ve vahşi IBR virüsünün PCR ile ayırt edilebilmesidir.

BVDV(Sığır Viral Diyare Virus) sığırlarda solunum, enterik, göz enfeksiyonları ve aynı zamanda abortlara neden olan viral bir hastalıktır. E2 yüzey

glikoproteini virus üzerindeki bir immunojendir ve BVDV'nin E2 protein genini kullanarak DNA aşılması hastalığa karşı koruma sağlamaktadır [21]. E2 proteini geni ile yapılan DNA aşılamanın ardından rekombinant E2 proteini ile bir rapel aşılamanın BVDV patojenik NY suşuna karşı iyi koruma sağladığı ortaya konulmuştur [16].

Sığırlarda shipping fever ile koyun ve keçilerde başlıca pnömoniye neden olan *M. haemolytica*'ya yönelik kullanılan aşılar, etkenin primer virüls faktörü olan lökotoksin üzerine odaklanmıştır. Lökotoksin geni, hücre hatlarında olduğu kadar bitkilerde de klonlanmış, eksprese edilmiş ve rekombinant proteinin lökotoksin nötralizan antikorları uyardığı belirlenmiştir [15]. PlpE olarak adlandırılan, büyük bir *M. haemolytica* yüzey lipoproteinini de potansiyel aşı adayı olarak tanımlanmış ve buna karşı oluşan antikorların kompleman aracılı *M. haemolytica*'yı öldürmede etkili olduğu bildirilmiştir. Bir rekombinant PlpE proteini laboratuvarında eksprese edilmiş, ticari bir *M. haemolytica* aşısına eklenmiş ve buzağılarda korunmayı arttırdığı bildirilmiştir [5].

Yeni doğanlarda öldürücü ishallerine neden olan enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)'lerde bulunan piluslar, *E.coli*'nin bağırsak epiteline adezyonunu, ve kolonizasyonunu sağlayarak infeksiyonun oluşumuna neden olurlar. K99 fimbrial antijene sahip *E. coli* suşları genellikle sığır, koyun ve keçilerde ishale neden olmaktadır. FanC, bu immunojenik K99 proteininin ana alt birimidir. Bitkilere yabancı genlerin verilmesi için bir yöntem olan *Agrobacterium* aracılı transformasyon, yenilebilir bir aşı geliştirilmenin ilk adımı olarak, K99'un FanC alt birimini soya fasulyesinde eksprese etmek, üzere başarılı bir şekilde kullanılmıştır [26]. Farelere soya fasulyesinden ekstrakte edilen protein enjekte edildiğinde, FanC'ye spesifik antikorlar ve sitotoksik T hücreleri yanıtlarının geliştiği bildirilmiştir [11].

*Brucella abortus* için genetik olarak tasarlanmış aşılarda (rekombinant genler, proteinler, vektörler ve modifiye *B. abortus* suşları) geliştirilmesi, etkinliğinin test edilmesi ve immunolojik cevapların değerlendirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte birkaç istisna dışında, bu rekombinant aşılarda çoğu hedef tür olan sığırdaki test edilememiş veya sığırlarda koruma oluşturamamıştır [9].

**Kanatlılarda rekombinant aşılar:** Kümes hayvanları için ABD'de lisanslı 11 tane rDNA aşısı bulunmaktadır. Bu aşılarda 10 tanesi, konakçının bağışıklık sistemini uyarmak için spesifik genler vermek amacıyla tasarlanmış canlı rekombinant viral vektör aşılardır. Bunlardan yedi tanesinde seçilen patojen genleri eksprese etmek için vektör olarak zayıflatılmış kanatlı çiçek virüsü (FPV) kullanılmaktadır. Üçünde ise zayıflatılmış, Marek hastalığı virusu (MDV) veya vektör olarak yakından ilişkili patojen olmayan hindi Herpesvirusu kullanılmaktadır. Bakteriyel patojen olan *Salmonella* spp. için sadece bir lisanslı aşı vardır. Bu aşı zayıflatılmış bir bakteride çift gen silinmesiyle oluşturulan mutant bir aşıdır [11].

**Balıklar için rekombinant aşılar:** Su ürünleri yetiştiriciliğinde yaklaşık 20 yıldır aşı kullanımı yaygınlaşmıştır. Balık aşılarda; deniz ve tatlı su balıklarını etkileyen viral ve bakteriyel patojenleri içeren konvansiyonel aşılardır [11]. ABD'de şu anda balıklar için kullanılan rekombinant aşı bulunmamaktadır. Norveç'te rekombinant İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virus (IPNV) aşısı, Şili'de SRS ve IPNV için subunit rekombinant bir aşı, Kanada'da çiftliklerde yetiştirilen Atlantik somonunda İnfeksiyöz Hemorajik Nekroz Virus (IHNV) için bir DNA aşısı onaylanmıştır. IPNV aşısı, virus parçacıklarının ve önemli bir antijenin ana bileşenini oluşturan VP2 proteinine dayanmaktadır [11]. Kanada'daki IHNV aşısı, hayvanlarda kullanılan ilk DNA aşısıdır. Viral hemorajik septisemi, dünya genelinde balıkları etkileyen ve alabalıklarda da ciddi kayıplara neden olan rhabdovirusun neden olduğu bir hastalıktır. Modifiye edilmiş bir Bakulovirus ile infekte olmuş ve virusun majör antijenik glikoproteinini içeren, böcek hücrelerinde üretilen rekombinant subunit aşısı geliştirilmiş olmakla birlikte, yüksek maliyetli olması nedeniyle ticari kullanım için ABD tarafından onaylanmamıştır [8].

**Kedi, köpek ve atlar için rekombinant aşılar:** Kanarya çiçek virusu, diğer kuş olmayan türlerde kullanılmak üzere bir virus vektörüne aktararak rekombinant aşı olarak denemeler yapılmıştır. Memelilerde serbest olmayan hücrelerde yineleme ve çoğalmayı tamamladığı ayrıca güçlü bir bağışıklık tepkisi uyandırdığı ve nonavian türlerde çoğalamadığı için güvenle kullanılmaktadır. Memelilerde kanarya çiçek virusu vektörleri tarafından uyarılan

hem humoral hem de hücresel bağışıklığın gelişimi ve korunma süresinin iyi olduğu bilinmektedir [22].

Köpek aşılı arasında RECOMBITEK Lyme, RECOMBITEK Canine Distemper, RECOMBITEK Ferret Distemper (ferretlerde kullanım için onaylanmıştır) ve PURVAX Canine Kuduz rekombinant aşılı bulunmaktadır. Ticari olarak bulunan Canarypox vektör temelli kedi aşılı; PUREVAX Feline Rabies, EURIFEL Feline Lösemi ve PUREVAX Feline Lösemi NF'yi içermektedir [11].

West Nile Virus (WNV), 2002'de ortaya çıkan ve tüm atların yaklaşık üçte birinde hastalık oluşturan sivrisinek yoluyla bulaşan viral bir hastalıktır. Merial firmasının RECOMBITEK WNV aşısı, atlar için koruyucu bağışıklık sağlayan; ancak ata çoğalmayan ve tamamen güvenli hale getiren bir aşıdır. İnfluenza'ya karşı Canarypox temelli rekombinant aşı (ProteqFlu, Merial) iki farklı vektör içerir. Bunlardan biri ABD at İnfluenza suşu, immünojenik hemagglutinin geni ve diğeri ise at İnfluenza virusunun Avrupa suşundan hemagglutinin genini taşır. ProteFlu-Te (Merial) aşısı, at İnfluenza Canarypox vektörlerini, tetanoz toksoidi sulandırıcı ajanı içerisinde içermektedir [11].

## Sonuç

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemelere bağlı olarak, konak bağışıklık istemi ve hastalık etkenlerinin genetik yapısı hakkındaki güncel çalışmalar sonucunda, şu anda hiçbir kontrol önleminin mevcut olmadığı hastalıklara karşı yeni aşılıların geliştirilmesi, günümüzün güncel koruma kontrol stratejilerinin başında yer almaktadır. Bu bağlamda moleküler biyoloji ve genetik bilim dallarının gelişimine paralel olarak, birçok hastalığa karşı kullanılmakta olan rekombinant aşılı geliştirilmiştir. Bilim adamları geleneksel aşı uygulama yollarını kullanmanın yanı sıra birçok bireyi aynı anda aşılamaı sağlayan ve enjeksiyonun olmadığı yeni sistemler üzerine de çalışmaktadır. Sonuç olarak; rekombinant aşılı üzerine yapılacak olan yeni çalışmaların, mevcut aşılıların uygulanma yollarına alternatif sunmaya, aşılı olmayan fakat ekonomik açıdan önemli hastalıklar için aşılıların geliştirilmesine veya koruma sağlamayan ya da yetersiz kalan mevcut aşılıların güncellenmesine odaklanması gerekmektedir.

## Kaynaklar

1. Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA, (2004). *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 101, 251-257.
2. Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Singh RK, (2006). *Biotechnology in the production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health.* *J Anim Vet Adv.* 5(6), 487-495.
3. Barbour EK, Hamadeh SK, Eidt A, (2000). *Infection and immunity in broiler chicken breeders vaccinated with a temperature-sensitive mutant of Mycoplasma gallisepticum and impact on performance of offspring.* *Poult Sci.* 79, 1730-1735.
4. Chalmers WS, Simpson J, Lee SJ, Baxendale W, (1997). *Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion.* *Vet Rec.* 141, 63-67.
5. Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Wray JH, (2006). *Recombinant Mannheimia haemolytica serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial M. haemolytica vaccine-induced resistance against serotype 6 challenge.* *Vaccine.* 24, 2248-2255.
6. Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviere M, (1995). *Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens.* *Virol.* 211, 481-490.
7. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchel CJI, Bowen R, Bunning ML, (2001). *West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzymelinked immunosorbent assays.* *J Virol.* 75, 4040-4047.
8. de Kinkelin P, Bearzotti M, Castric J, Nougayrede P, Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, (1995). *Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France.* *Vet Res.* 26, 379-387.
9. Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP, (2015). *Recent advances in Brucella abortus vaccines.* *Vet Res.* 46, 76.
10. Ellis RW, (1999). *New technologies for making vaccines.* *Vaccine.* 17, 1596-1604.
11. Jackwood MW, Hickie L, Kapil S, Silva R, (2008). *Vaccine Development Using Recombinant DNA Technology.* *Animal Agriculture's Future through Biotechnology(CAST) Part 7,*413-40-02.
12. Jackwood MW, Saif YM, (1985). *Efficacy of a commercial turkey coryza vaccine (Art-Vax) in turkey poults.* *Avian Dis.* 29, 1130-1139.
13. Jacobs AA, Goovaerts D, Nuijten PJ, Theelen RP, Hartford OM, Foster TJ, (2000). *Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated Streptococcus equi.* *Vet Rec.* 2147, 563-567.
14. Khan S, Ullah MW, Siddique R, (2016). *Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life.* *Int J Genomic.* 2405954.

15. Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY, (2001). *Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin 50 fusion protein*. Infect Immun. 69, 5786-5793.
16. Liang R, van den Hurk JV, Babiuk LA, van Drunen Littell-van den Hurk S, (2006). *Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from bovine viral diarrhoea virus in cattle*. J Gen Virol. 87, 2971-2982.
17. Mackowiak M, Maki J, Motes-Kreimeyer L, Harbin T, Van Kampen K, (1999). *Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology*. Adv Vet Med. 41, 571-583.
18. Minke JM, Audonnet JC, Fischer L, (2004). *Equine viral vaccines: the past, present and future*. Vet Res. 35, 425-443.
19. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM, (2004). *Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status*. Vet Res. 35, 1-38.
20. Morrow CJ, Markham JF, Whithear KG, (1998). *Production of temperature-sensitive clones of Mycoplasma synoviae for evaluation as live vaccines*. Avian Dis. 42, 667-670.
21. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME, (2003). *DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge*. Vaccine. 21, 2082-2092.
22. Paoletti E, (1996). *Applications of pox virus vectors to vaccination: An update*. Proc Natl Acad Sci USA. 93, 11349-11353.
23. Pardo MC, Mackowiak M, (1999). *Efficacy of a new canine-origin, modified-live virus vaccine against canine coronavirus*. Canine Pract. 24, 6-8.
24. Park MS, Steel J, Garcia-Sastre A, Swayne D, Palese P, (2006). *Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease*. Proc Natl Acad Sci USA. 103, 8203-8208.
25. Pastoret PP, Brochier B, Languet B, Thomas I, Paquot A, Bauduin B, Kieny MP, Lecocq JP, De Bruyn J, Costy F, (1988). *First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus*. Vet Rec. 123, 481-483.
26. Piller KJ, Clemente TE, Jun SM, Petty CC, Sato S, Pascual DW, Bost KL, (2005). *Expression and immunogenicity of an Escherichia coli K99 fimbriae subunit antigen in soybean*. Planta. 222, 6-18.
27. Serge C, Gael K, Scott EL, (2000). *Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation*. Fish Shellfish Immunol. 10, 711-723.
28. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, (1996). *Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines*. Vet Microbiol. 53, 43-54.